

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

特公昭 4 2 - 1 1 8 6

(16)

PN=JP 67001186

WPI Acc No: 66-25814F/196800

Process for the prep of 5-inosinic acid from inosine by means of micro -  
bes

Patent Assignee: KIKKOMAN SHOYU CO LTD (KIKK )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
JP 67001186	B						196800 B
?T S4/7/1							

4/7/1

DIALOG(R)File 352:DERWENT WPI

(c) 2000 DERWENT INFO LTD. All rts. reserv.

000525251

WPI Acc No: 66-25814F/196800

Process for the prep of 5-inosinic acid from inosine by means of micro -  
bes

Patent Assignee: KIKKOMAN SHOYU CO LTD (KIKK )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
JP 67001186	B						196800 B

Abstract (Basic): JP 67001186 B

preparation of 5'-inosinic acid by treating inosine with  
Pseudomonas ovalis H-65 or Bacillus subtilis R-53-2, which are  
separated from the soil, and using potassium primary phosphate or  
sodium pyrophosphate etc. as a source of phosphoric acid.

Mycrological properties of Pseudomonas ovalis H-65 are detailed in  
the patent.

The patent allows the preparation of 5'-inosinic using cheaper  
sources of phosphoric acid.

Derwent Class: B00

16 E 611.2  
(36 H 3)

特 許 公 報

特 許 出 願 公 告  
昭42-1186  
公 告 昭 42. 1. 20

(全4頁)

微生物によるイノシンより5'-イノシン酸の製造法

特 願 昭 38-60464  
出 願 日 昭 38. 11. 9  
発 明 者 杉山晋一  
野田市宮崎101  
同 齊藤成正  
同所  
同 横塚保  
千葉県東葛飾郡流山町江戸川台西  
1の134  
出 願 人 キッコーマン醤油株式会社  
野田市野田339  
代 表 者 茂木啓三郎  
代 理 人 弁理士 中島喜六

図面の簡単な説明

第1図は実施例1に記載せるカラムクロマトグラムを示す曲線図、第2図は実施例2に記載せるカラムクロマトグラムを示す曲線図である。

発明の詳細な説明

本発明は土壌より分離した細菌ブシユドモナス・オバリスH-65又はバチルス・ズブチリスR-53-2によるイノシンのリン酸化による5'-イノシン酸の製造法に関するもので、その目的とする所は、第1リン酸カリ、第1リン酸ソーダ、リン酸アンモン、ピロリン酸ソーダの如き、安価な無機リン酸塩をリン酸源として、ブシユドモナス・オバリスH-65、バチルス・ズブチリスR-53-2の有する酵素系によりイノシンにリン酸を付与し、5'-イノシン酸を安価に製造するにある。

此処に“両菌の有する酵素系による”とは両菌の生菌体、乾燥菌体及び菌体抽出液に因る酵素系を指すものである。

微生物によるイノシンのリン酸化による5'-イノシン酸の生成は報告がないわけではなく、即ち、アグリカルチャル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー27, 6, 469に記載せる如く、H. Katagiri, H. Yamamoto, K. Mitsugi, M. Takahashi 等によるパラニトロフェニルリン酸をリン酸源とする方法が知られておるが、前記の如き

無機リン酸塩をリン酸源とする微生物によるイノシンより5'-イノシン酸の製造法は知られていない。

本発明者は有機リン酸塩をリン酸源として、イノシンにリン酸を付与し、5'-イノシン酸を生成する微生物を拡く検索した結果後記に詳述する如き菌株、培地、培養法及び反応法により、第1リン酸カリ、第2リン酸カリ、第1リン酸ソーダ、前記のピロリン酸の如き無機リン酸塩をリン酸源としてイノシンと共に反応せしめ、5'-イノシン酸を反応液中に多量に蓄積せしめる事に成功した。

次に発明の詳細につき述べる。

土壌より分離した細菌を集め、前記のリン酸塩を用い、イノシンのリン酸化の活性を比較した結果活性ある菌株として、H-65、R-53-2を選択し、バージェーのマニアル・オブ・データミネタイプ・バクテリオロジー第7版に従い、同定した結果、ブシユドモナス・オバリスH-65、バチルス・ズブチリスR-53-2と同定した。

今ブシユドモナス・オバリスH-65の菌学的性質を示すと次の通りである。

- (1) 形 状  
杆状、先端が円い、単独、運動性あり、先端から1本又は2本位の鞭毛が出ている。
- (2) 寒天培地  
集落は正円形(circular, entire)で光沢あり、
- (3) 寒天斜面  
集落は豊富(abundant)、白緑色、バター状。
- (4) 肉汁培地  
混濁、表面に膜状のものが出来る(pellicle)、モヤモヤした沈澱(flocculent sediment)が出来る。
- (5) 馬鈴薯  
褐色(brownish)、バター状。
- (6) ブイシンスキー培地  
可溶性色素(diffusible pigment)を生成し緑色の螢光を発する。
- (7) ゼラチン培地  
生育する。
- (8) ゼラチン穿刺  
液化しない。表面に近くかすかに緑色を呈する。
- (9) ミルク培地  
生育する、リトマスを選元せず、+アルカリ反

応を呈し、ミルクは変化しない。

(0) インドールの生成

インドールの生成は一定しない (variable)。

(1) 好気性

(2) 生育温度

20.0~37.0℃で良好の生育。

(3) 菌の分離源

土壌から分離採取。

(4) 硝酸塩の還元

硝酸塩から亜硝酸塩を作る。

(備考) 前記菌学的性質は本発明者等の分類学的研究の結果によるものである。

培地及び培養方法

該菌を肉エキス10g/l (極東エーリツヒ)、ポリペプトン10g/l、食塩5g/lの組成を有し、pH7.0~7.2に調整した培地、或いは前記培地に1%グルコースを添加せる培地に磷酸カリ、硫酸マグネシウム等菌の生育に必要な塩類を添加した合成培地 (pH7.0~7.2に調整) を120℃、10分間殺菌したもの、又はグルコースを炭素源とし磷酸アンモンをN源とし、更に前記の無機塩を添加し pH を7.0に調整し、120℃で10分間殺菌したものを種培地及び本培地とする。

前記菌株を予め24時間肉汁寒天に斜面培養したものを一白金耳接種する。種菌培養は試験管又は肩付フラスコを用い、30℃にて15時間乃至18時間振盪培養又は斜面培養又は静置培養を行い、得られた培養液又は菌体を本培地に接種、8時間乃至24時間振盪培養、或いは通気攪拌培養或いは静置培養を行う。

酵素調整法

培養後菌体を冷凍遠心機にて集め、蒸留水で1回洗滌後1/10Mアセテートバッファー pH5.0に懸濁し、酵素源とする。又は洗滌菌体を0~2℃の水室にて冷アセトンで常法によりアセトン乾燥標品とし、之をアセテートバッファー pH5.0に懸濁し、酵素源とする。

又は、洗滌菌体を等量のアリミナと共に磨砕1/10Mアセテートバッファー pH5.0にて抽出するか、或いは菌体をフレンチプレスにて破壊し、前記バッファーにて抽出して酵素源とする。

反 応

此の酵素液、或いは菌体懸濁液、或いはアセトン乾燥標品懸濁液とイノシン及び第1磷酸カリ、ピロリン酸ソーダ、磷酸アンモン等の磷酸塩の水溶液を混じ、之にトルエンを添加するか、或いは添

加せずして37℃にて1時間乃至24時間振盪しながら反応を行う。反応終了後反応液より遠心機にかけて菌体或いは酵素蛋白を除き、40℃以下にて濃縮し、濃縮液をアニオン交換樹脂 (DoweX-1) 或いはアニオン交換樹脂と活性炭の併用により純粋な5'-イノシン酸含有液を分離し、5'-イノシン酸を単離するにある。

5'-イノシン酸の生成の確認は実施例にて詳記するが方法は次の如くである。

(1) 濃縮液のペーパークロマトグラフィーによる純品との Rf 値の比較。

(2) ペーパークロマトグラム上のスポットを切り抜き1Nアンモニア水にて抽出し、抽出液の紫外部吸収曲線。

(3) ハンスイッシャーウッド試薬の散布による燐の検出。

(4) メタ・過沃度酸による酸化により生成するアルデヒドの検出により、5'-、3'-異性体の確認 (シッフの反応)。

(5) カラムクロマトグラムのその純品との比較。

実施例 1

ブシドモナス・オパリス H-65 を肉エキス10g、ポリペプトン10g、食塩5g/l、pH7.2の組成を有する培地にて18時間振盪培養を行い、培養液2mlを同組成培地を500mlの肩付フラスコに100mlずつ分注し、120℃、10分間殺菌した培地2本に接種し、10時間30℃にて振盪培養を行い、培養後菌体を冷凍遠心機にて (6000回転、15分) 集め、生菌体2.3gを得た。之を1/10Mアセテートバッファー pH5.0、25mlに懸濁し、モノ式振盪装置にて反応を行つた。反応液の内容は次の通りである。

菌懸濁液	25ml (2.3g)
イノシン	10 <sup>-2</sup> M 10ml (26.8mg)
第1磷酸カリ	10 <sup>-2</sup> M 20ml
トルエン	1.5ml

37℃にて2時間反応せしめ、終了後40℃以下にてトルエンを吸引除去し、毎分10,000回転、10分間の冷凍遠心操作により菌体を除く。

上澄液を更に40℃以下にて真空濃縮し、約5mlにする。此の濃縮液につき、ペーパークロマトグラフィーを行い純品の5'-イノシン酸と同 Rf 値を示すスポットを確認し、そのスポットにつき次の性質を調べ、5'-イノシン酸の生成を確認した。

	本発明濃縮液 ス ポ ッ ト	5'-イノシン 酸	3'-イノシン 酸	イノシン
最大吸収波長 (1Nアンモニア中)	252mμ	252mμ	252mμ	252mμ
モリブデン酸ソーダによる磷の検出	+	+	+	-
メタ-過沃度酸ソーダ-フクシン反応	+	+	-	+

次いで濃縮液をDoweX-1×4 100~200メッシュHCOO<sup>-</sup>型カラムに吸着せしめ、ステップワイズ方式により蟻酸、蟻酸ソーダで溶出せしめ、第1図に示す如きクロマトグラムを得たが、ピークは純品の5'-イノシン酸と同位置であり、そのフラクションの最大吸収波長は純品の同溶媒中の最大吸収波長と同様250mμであつた。そのフラクションの有機塩基成分の定量から18.072mgの5'-イノシン酸を確認した。

#### 実施例 2

ブシウドモナス・オバリスH-65を実施例1と同様の培地を用い同様の方法で1l培養し菌体を集め常法によりアセトン乾燥標品を作り、乾燥菌体1.33gを得た。

中265mgをとり、30mlのアセテートバッファーpH5.0に懸濁せしめ、次の反応液組成で37℃、3時間振盪しながら反応せしめ、反応液の有機塩基成分の測定から28.859mgの5'-イノシン酸の生成を見た。

第2図にDoweX-1×4 HCOO<sup>-</sup>型カラムを用いたクロマトグラムを示す。

#### 反応液組成

乾燥標品懸濁液	30ml
イノシン	10 <sup>-2</sup> M 10ml (26.8mg)
第1磷酸カリ	10 <sup>-2</sup> M 20ml
トルエン	1ml

更に此のフラクションを集め、良く洗滌した活性炭に吸着せしめ水洗後、エタノール(99.5%) : 水 : アンモニア水(28%) = 50 : 45 : 5で溶出し、溶出液を40℃以下で乾固し、5'-イノシン酸粉末22.1mgを得た。

#### 実施例 3

ブシウドモナス・オバリスH-65を実施例1と同様の培地及び培養法により培養し、菌体懸濁液を作り、次の反応組成にて37℃、4時間振盪しながら反応を行い、反応液の有機塩基成分の測定から8.718mgの5'-イノシン酸の生成を見た。

#### 反応液組成

菌体懸濁液	25ml
イノシン	10 <sup>-2</sup> M 10ml

ピロリン酸ソーダ	10 <sup>-2</sup> M 20ml
トルエン	1.5ml

#### 実施例 4

ブシウドモナス・オバリスH-65を1%グルコース添加ブイヨン培地を用い、実施例1と同操作で、12時間培養し、培養菌体をアセテートバッファーpH5.0に懸濁し、次の反応組成で37℃、3時間振盪しながら反応せしめ、反応液の有機塩基成分測定から6.845mgの5'-イノシン酸の生成を見た。

#### 反応液組成

菌体懸濁液	25ml
イノシン	10 <sup>-2</sup> M 10ml
磷酸アンモン	10 <sup>-2</sup> M 20ml

#### 実施例 5

ブシウドモナス・オバリスH-65を実施例1と同培地を用い、同方法にて16時間培養し、培養菌体をアセテートバッファーpH5.0に懸濁し、次の反応組成で37℃で4時間振盪しながら反応せしめ反応液を実施例1と同一条件で処理し、6.015mgの5'-イノシン酸の生成を確認した。

#### 反応液組成

菌体懸濁液 (アセテートバッファーpH5.0)	25ml (2.3g/25ml)
イノシン	10 <sup>-2</sup> Mol 10ml
第1磷酸ソーダ	10 <sup>-2</sup> Mol 20ml
トルエン	1.5ml

#### 実施例 6

本発明者が土壌から分離した新菌バチルス・ズブチリスR-53-2を、肉エキス10g/l、ポリペプトン10g/l、食塩5g/l、pH7.0の培地を用い、実施例1と同様の操作により18時間培養し、培養菌2.5gを得た。之を実施例記載のバッファーに懸濁し菌体懸濁液を調整し、次の反応液組成にて、37℃、24時間振盪しながら反応を行わしめ、反応液の諸性質の検討(実施例1を参照)及び有機塩基測定より6.72mgの5'-イノシン酸を確認した。

#### 反応液組成

菌体懸濁液	25ml
-------	------

(4)

特公 昭42-1186

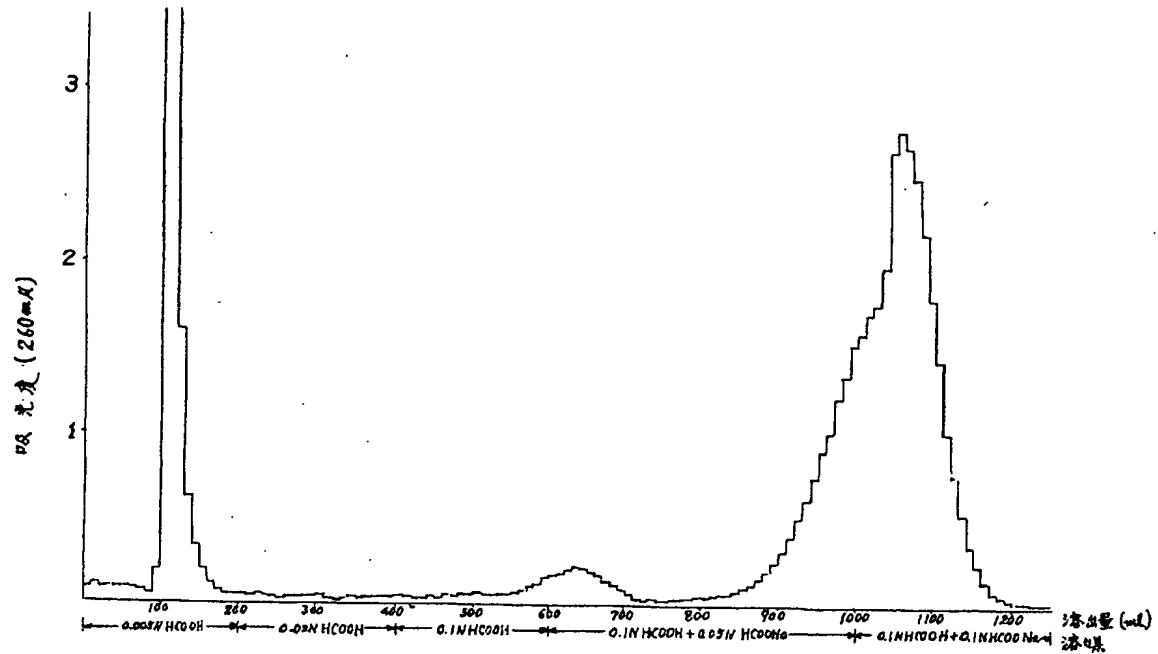
イノシン  $10^{-2}M$  10ml  
 第1磷酸カリ  $10^{-2}M$  20ml  
 トルエン 1.5ml

の無機磷酸塩を含有する反応液中でプシウドモナス・オバリスH-65、若くはバチルス・ズブチリスR-53-2の生菌体又はその抽出物或は生菌体をアセトン処理し、乾燥して得た粉末を添加して反応を行わしめる事を特徴とする微生物によるイノシンより5'-イノシン酸の製造法。

## 特許請求の範囲

1 イノシンと第1磷酸カリ、磷酸アンモン、ピロ磷酸ソーダ、第1磷酸カリ、第1磷酸ソーダ等

第1図



第2図

